Aus der
Medizinischen Poliklinik der Universität Marburg.
Direktor: Professor Dr. Klewitz.

Pharmakologische Untersuchungen

über die

Wirkung des Harnstoffes an Pflanzensamen (Lupinus albus)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Wilhelm Moritz
Medizinal-Praktikant.

Marburg 1935.

Buchdruckerei G. Uschmann in Weimar.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät Marburg
am 12. Dezember 1934.

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Referent: Professor Dr. Klewitz.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Das Interesse, das dem Harnstoff von der experimentellen Medizin entgegengebracht wird, war bis vor kurzem noch gering. Als hauptsächlichstes Endprodukt des Eiweißstoffwechsels galt das Diamid der Kohlensäure als eine Substanz, die als Stoffwechselschlacke kein besonderes Interesse für sich in Anspruch nehmen konnte, trotzdem über ihre Wirkung im Experiment eine ganze Reihe von Einzeltatsachen bekannt geworden war. Bekannt sind vom Harnstoff, abgesehen von seinem chemischen Verhalten, seine gefäßerweiternde Wirkung, die auch eine der Komponenten der vom Therapeuten verwandten diuretischen Wirkung des Harnstoffes darstellt. Pharmakologisch ist der Harnstoff weiterhin gekennzeichnet durch seine Reflexerregbarkeitssteigerung, die im Experiment bis zu Krämpfen gesteigert werden kann. Hierzu sind freilich sehr große Dosen erforderlich, denn der Harnstoff ist eine Substanz, die als relativ ungiftig angesprochen werden muß. Ferner ist der Harnstoff dadurch gekennzeichnet, daß sein osmotischer Druck ein sehr geringer ist und er, bestimmten Lösungen zugesetzt, deren osmotischen Druck gegenüber dem Wasser stark herabsetzt. Bemerkenswert ist außerdem seine Fähigkeit, in hohem Maße in tierische Zellen einzudringen, ohne daß hierbei osmotische Störungen beobachtet werden.

Erst in den letzten Jahren ist dem Harnstoff auf Grund der Arbeiten von Baur und seinen Mitarbeitern ein stärkeres Interesse entgegengebracht worden. Baur [1]) fand, daß der Harnstoff in bestimmten Versuchsanordnungen die Durchlässigkeit von tierischen Zellen erhöht. Diese Wirkung des Harnstoffes ist nach seinen Angaben reversibel narkotisierbar. Baur und seine Mitarbeiter haben es unternommen, ein großes Versuchsmaterial zusammen zu tragen, um diese Wirkung an den verschiedensten Versuchsmodellen aufzuzeigen.

Baur fand, ausgehend von Diureseversuchen an Kaninchen und an der Maus, daß bei intravenöser Injektion von Vitalfarbstoffen eine intensivere Speicherung der Farbstoffe in den inneren Organen stattfindet, wenn Harnstoff der Injektionsflüssigkeit zugesetzt wird. Besonders überzeugend ließ sich dies mit Trypanblau zeigen, wo unter Harnstoff die Mäuse völlig durchgefärbt wurden, während dies ohne Harnstoff nicht eintrat.

Eine ähnliche Versuchsanordnung wählte Hoffmann [2]), der mittels subcutaner, intravenöser und intraperitonealer Injektion im Maus-

versuch zeigen konnte, daß bei einigen Farbstoffen eine bessere Anfärbbarkeit des Gehirns bei gleichzeitiger Harnstoffinjektion in Erscheinung tritt. Auch in Durchströmungsversuchen mit Rana esculenta und Rana temporaria ergab sich dieser Befund.

Kroeplin [3]) fand, daß die Diffusion von Farbstoffen durch Froschhäute mittels ein- bis zehnprozentigem Harnstoffzusatz stark beschleunigt und quantitativ vermehrt wird. Die Größe der Diffusion erwies sich abhängig vom Lösungszustand der Farbstoffe und stieg mit Erhöhung der Harnstoffkonzentration. Methylenblau, ein Farbstoff, der ohne Harnstoff gar nicht diffundierte, diffundierte nach Harnstoffzusatz.

Lorenz [4]) zeigte in Ausscheidungsversuchen am Frosch, daß bei oraler Verabfolgung wie bei Injektion in den Brustlymphsack saure und basische Farbstoffe unter Harnstoffzusatz rascher ausgeschieden werden. Von ihm nach der Schulemannschen Methode vorgenommene Diffusionsversuche in 2 %iger Gelatine ergaben, daß bei bestimmter Versuchsanordnung die sauren Farbstoffe unter 1 %igem Harnstoffzusatz schneller und in stärkerem Ausmaß diffundieren. Bei basischen Farbstoffen dagegen zeigte sich eine geringe Hemmung der Diffusion gegenüber Kontrollen ohne Harnstoff. Einige Farbstoffe, die ohne Harnstoff überhaupt nicht diffundierten, diffundierten unter Harnstoffzusatz.

Versuche mit dem Mondschen Froschdarmdurchströmungspräparat, die von Mißfeldt [5]), Fries [6]), Hermelingmeier [7]) und zuletzt von Fatheuer [8]) vorgenommen wurden, ergaben, daß die Säurefarbstoffe Cyanol, Eosin und Indigo-Carmin nur dann vom Darm resorbiert werden, wenn der in den Darm gebrachten Farblösung Harnstoff zugesetzt wird. Noch schneller als in dieser Versuchsanordnung wurden die Farbstoffe resorbiert, wenn der Harnstoff statt der Farblösung im Darm der Gefäßdurchströmungsflüssigkeit zugesetzt wurde.

Von Fatheuer wurde gefunden, daß auch Farbstoffe, die an und für sich vom Darm aus resorbiert werden, unter Harnstoffzusatz schneller und in erhöhtem Maße zur Resorption gelangen.

In Auswertung dieser Versuchsergebnisse glaubte Baur schließen zu können, daß der Harnstoff als zelldurchlässigkeitssteigernde Substanz auch in der Lage ist, die Schwellenkonzentrationen von Giften herabzusetzen. Versuche in dieser Hinsicht wurden von Utz [9]) und Dellen [10]) mit Strychnin an Fröschen vorgenommen. Ihr Resultat war die Herabsetzung der Grenzkonzentration der krampfmachenden Wirkung dieses Giftes, wenn der Injektionsflüssigkeit Harnstoff zugesetzt wurde. Weiterhin ergab sich, daß die Giftwirkung des Strychnins unter Harnstoff schneller und intensiver als ohne Harnstoff eintrat.

Erwähnt sei in diesem Zusammenhang eine Arbeit von Keeser [11]),

der im Tierversuch fand, daß bei gleichzeitiger Verabreichung von Harnstoff die Giftigkeit des Morphins erhöht wird.

Daß durch Harnstoff auch die Permeabilität der Blut-Liquorschranke geändert werden kann, ergaben Arbeiten von Baur und Schumann [12]). Hier konnte gezeigt werden, daß saure Farbstoffe unter Harnstoff vermehrt in den Liquor übergehen. Der Säurefarbstoff Kongorot, der ohne Harnstoff überhaupt nicht in den Liquor übertritt, tut dies bei gleichzeitiger Injektion von Harnstoff.

Besonders auf Grund dieser letzterwähnten Arbeiten hält Baur es für möglich, daß dem Harnstoff im Krankheitsbild der Urämie dieselbe Wirkung wie im Experiment zukommt, indem bei dieser Erkrankung normale Stoffwechselprodukte — gedacht wird von ihm im Sinne der Vollhard-Becherschen Urämietheorie in erster Linie an Phenolkörper und aromatische Oxysäuren — Einlaß in Zellen des Körpers finden, die bei normalem Harnstoffgehalt des Blutes ihnen verschlossen sind. Er hält es für möglich, daß es so zur Verschiebung der Toxizitätsgrenzen dieser Stoffwechselprodukte kommt, so daß sie in Konzentrationen Giftwirkungen entfalten, in denen sie normalerweise nicht giftig sind.

Klewitz und Michalowsky [13]) versuchten, die durchlässigkeitssteigernde Wirkung des Harnstoffs an pflanzlichen Zellen nachzuweisen. Sie bedienten sich dabei folgender einfachen Versuchsanordnung:

Samen von Lupinus albus wurden in Farbstofflösungen mit und ohne Zusatz von Harnstoff gebracht, und es wurde untersucht, ob Farbstoff in Lösungen, in denen sich Harnstoff befand, in höherem Maße in die Bohnen eindringt als in Farblösungen ohne Harnstoff. Es ergab sich dabei, daß unter zahlreichen untersuchten Farbstoffen eine Reihe saurer und basischer Farben gefunden werden konnte, bei denen schon makroskopisch festzustellen war, daß mit Harnstoff ein vermehrtes Eindringen der Farben in die Bohnen stattfand.

Bei der mir zunächst gestellten Aufgabe, dieses bereits vorliegende Resultat nachzuprüfen und zu erweitern, habe ich mich unter teilweiser Verwendung anderer Farbstoffe folgender Methode bedient:

Mittels einer von Shiwe angegebenen Nährlösung wurden Farbstofflösungen in verschiedenen Konzentrationen hergestellt. Je 200 ccm so hergestellter Farblösung wurde in große Glasschalen gegossen, deren Deckel, um Belichtungsfehler zu vermeiden, schwarz lackiert waren. In vier von den insgesamt fünf für jeden Versuch verwandten Schalen wurde den Farblösungen Harnstoff in von Schale zu Schale steigenden Konzentrationen zugesetzt; die Farblösung in der fünften Schale diente als Kontrolle und blieb ohne Zusatz. In jede Schale wurden zehn Bohnen eingelegt. Die Temperatur im Versuchsraum schwankte zwischen 19 und 21 ° C. Ablesungen der Versuchsergebnisse erfolgten nach 24, 36 und 48 Stunden nach Einlegung der Bohnen.

Nach 48 Stunden wurden die Versuche abgebrochen, da ein Auskeimen der Bohnen unerwünscht war. Die Ablesungen wurden so vorgenommen, daß die Bohnen zu den angegebenen Zeiten in der Mitte durchgeschnitten und aufgeklappt wurden. Rein makroskopisch wurde dann festgestellt, ob und in welchem Ausmaß die untersuchten Farbstoffe in die Bohnen eingedrungen waren und inwieweit Differenzen in der Menge des eingedrungenen Farbstoffes zwischen Harnstoffbohnen und Nichtharnstoffbohnen vorhanden waren. In den nachfolgenden Versuchen bedeutet: —: Farbstoff nicht eingedrungen. +: Farbstoff in die äußeren Zellschichten eingedrungen. ++: Farbstoff etwa 2 mm in die Bohnen eingedrungen. +++: Bohnen fast völlig oder völlig durchgefärbt. (+) bedeutet, daß eine sichere Entscheidung über vermehrtes Eindringen nicht getroffen werden konnte. Diese makroskopische Ablesung bereitete keine Schwierigkeiten. Die Unterschiede waren so deutlich, daß gröbere Fehler ausgeschlossen werden konnten. Fehlerquellen durch stark wechselnde Temperatur und Belichtung kamen bei den Versuchen nicht in Frage, da, wie erwähnt, die Temperatur des Versuchsraumes einigermaßen konstant war und Belichtungsfehler durch die Schwarzfärbung der Deckel vermieden wurden*).

Es folgen jetzt Versuche mit 2 sauren und 2 basischen Farbstoffen:

Saure Farbstoffe.

Anilinblau.

Versuch Nr. 1.

200 ccm einer 0,2 % Anilinblaulösung in jeder Schale.
Temperatur 20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Färbung ohne Harnstoff	Färbung mit Harnstoff			
		0,2 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
24 Stunden . .	+	+	+	+	+
36 „ . .	+	+	+	+	++
48 „ . .	++	++	++	++	+++

*) Durch van Rysselberghe [14]) ist bekannt, daß die Geschwindigkeit des Durchtritts gelöster Substanzen durch die Plasmahäute stark von der Temperatur abhängig ist. Lepeschkin [15]) und Tröndle [16]) zeigten die Abhängigkeit der Permeabilität von Pflanzenzellen vom Ausmaß der Belichtung.

Cyanol.

Versuch Nr. 2.

200 ccm einer 0,2 % Cyanollösung in jeder Schale.
Temperatur 19—20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Färbung ohne Harnstoff	Färbung mit Harnstoff			
		0,2 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
24 Stunden . .	+	+	+	+(+)	++
36 „ . .	++	++	++	++(+)	+++
48 „ *) .	+++	+++	+++	+++	+++

Basische Farbstoffe.

Neutralrot.

Versuch Nr. 3.

200 ccm einer 0,2 % Neutralrotlösung in jeder Schale.
Temperatur 19—20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Färbung ohne Harnstoff	Färbung mit Harnstoff			
		0,2 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
24 Stunden . .	+	+	+	+	+
36 „ . .	+	+	+	+	++
48 „ . .	++	++	++	++	+++

Bismarckbraun.

Versuch Nr. 4.

200 ccm einer 0,2 % Bismarckbraunlösung in jeder Schale.
Temperatur 19—20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Färbung ohne Harnstoff	Färbung mit Harnstoff			
		0,2 %	0,3 %	0,5 %	1,0 %
24 Stunden . .	+	+	+	+	+
36 „ . .	+	+	+	++	++
48 „ . .	++	++	++	++	+++

*) Nach 48 Stunden sind die Bohnenzellen vom Cyanol in allen Lösungen so intensiv durchtränkt, daß ein Unterschied im Durchgefärbtsein der Harnstoffbohnen und der Nichtharnstoffbohnen nicht zu erkennen ist.

Wie die Tabellen zeigen, findet in den 1 %igen, teilweise auch in den $^1/_2$ %igen Harnstofflösungen bei Prüfung mit 2 sauren und 2 basischen Farbstoffen ein stärkeres Eindringen der Farbstoffe gegenüber den Kontrollösungen statt. Dagegen war bei den unter $^1/_2$ % liegenden Harnstoffkonzentrationen kein vermehrtes Eindringen der Farbstoffe gegenüber den Kontrollösungen festzustellen. Dieses Ergebnis stimmt völlig mit den von Klewitz und Michalowsky gefundenen Resultaten überein.

Während des Versuchsverlaufes fiel bei Versuch Nr. 3 auf, daß nach 24 Stunden die dunkelrote Farbe des Neutralrotes einen Umschlag in gelbbraun erfuhr und der Farbstoff teilweise in dieser Farbe ausflockte. Ferner war auffallend, daß sich in den 1 %igen Harnstofflösungen ein schon nach 24 Stunden deutlicher Geruch nach NH_3 entwickelte. Die Prüfung mit Lackmuspapier ergab, daß diese Lösungen alkalisch reagierten.

Aus dieser Beobachtung heraus erhob sich die Frage, ob das vermehrte Eindringen der Farbstoffe bei Zusatz von Harnstoff mit der festgestellten Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration in irgendeinem Zusammenhang stand. Für diese kam allein die Zerlegung des Harnstoffs in Ammoniak und Kohlensäure nach der Formel $CO(NH_2)_2 + H_2O = CO_2 + 2NH_3$ in Betracht. Als Endprodukt entsteht bei diesem Prozeß Ammoniumkarbonat. Es galt nun, zu untersuchen, ob die gefundene Diffusionsvermehrung nach Harnstoffzusatz als eine Ammoniumkarbonatwirkung zu erklären war. Zu diesem Zweck wurden nacheinander folgende Wege eingeschlagen:

1. Wiederholung der Versuche mit Ammoniumkarbonat an Stelle des Harnstoffes.
2. Versuch, die Harngärung zu verhindern.

Es folgen Versuche mit verschiedenen Ammoniumkarbonatkonzentrationen:

Cyanol.

Versuch Nr. 5.

200 ccm einer 0,2 % Cyanollösung in jeder Schale.

Temperatur 19—20° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Färbung ohne $(NH_4)_2CO_3$	Färbung mit $(NH_4)_2CO_3$			
		0,05 %	0,075 %	0,1 %	0,5 %
24 Stunden . .	+	+	+	+	++
36 „ . .	++	++	++	++	+++
48 „ *) . .	+++	+++	+++	+++	+++

*) Nach 48 Stunden ist eine so völlige Durchtränkung mit Farbstoff eingetreten, daß Unterschiede zwischen Ammoniumkarbonatbohnen und Nicht-Ammoniumkarbonatbohnen nicht zu erkennen sind.

Neutralrot.

Versuch Nr. 6.

200 ccm einer 0,2 % Neutralrotlösung in jeder Schale.
Temperatur 20—21 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Färbung ohne $(NH_4)_2CO_3$	Färbung mit $(NH_4)_2CO_3$			
		0,01 %	0,075 %	0,1 %	1,0 %
24 Stunden . .	+	+	+	+	+
36 „ . .	+	+	+	+(+)	++
48 „ . .	++	++	++	++	+++

Die Versuche zeigen, daß Ammoniumkarbonat tatsächlich die Durchlässigkeit der Bohnenzellen in erheblichem Maße steigert. Die Grenzkonzentration der diffusionssteigernden Wirkung liegt bei 0,1 % Ammoniumkarbonat.

Die Wirkung des Ammoniumkarbonats zeigt sich damit schon in Konzentrationen, wo unter gleichen Bedingungen mit Harnstoff angestellte Versuche keine diffusionssteigernde Wirkung erkennen ließen.

Durch dieses Ergebnis wurde es sehr nahe gelegt, die in den ersten Versuchen gefundene Diffusionsvermehrung als Ammoniumkarbonatwirkung anzusprechen. Vergleiche der eingedrungenen Farbstoffmenge in den ersten Versuchen mit den bei den Ammoniumkarbonatversuchen ergaben, daß der Wirkung einer Farbstofflösung mit 1 % Harnstoff in den Ammoniumkarbonatversuchen eine Konzentration von 0,5 % Ammoniumkarbonat entsprach. Es erschien damit von vornherein nicht wahrscheinlich, daß die gefundene Diffusionsvermehrung bei Harnstoffzusatz allein eine Ammoniumkarbonatwirkung war, vielmehr war daran zu denken, ob nicht in diesen Versuchen ein Synergismus zweier im Sinne der Durchlässigkeitssteigerung wirksamer Substanzen vorlag.

Um hier weiter zu kommen, wurde versucht, die Zerlegung des Harnstoffes zu verhindern. Wie bekannt, kann diese auf zwei Wegen zustande kommen, einmal durch harnspaltende Bakterien, zweitens war daran zu denken, daß in der großen Gruppe der Phanerogamen gerade unter den Lupinensamen harnstoffspaltende Fermente ein sehr häufiges Vorkommnis sind. Durch die Untersuchungen von G. Muenk [17]) ist dargelegt worden, daß fast alle Lupinensamen solche Ureasen in wechselnder Menge enthalten.

Um eine durch Bakterien hervorgerufene Harnstoffhydrolyse konnte es sich nicht handeln, da es durch Hemmung des Bakterienwachstums mit typischen Harnkonservierungsmitteln wie Toluol,

Thymol, Chloroform nicht gelang, die Harnstoffzersetzung wesentlich zu beeinträchtigen.

Bei den mit diesen Mitteln vorgenommenen Versuchen wurde die Untersuchung auf Ammoniak in der Weise vorgenommen, daß am Deckel der verwandten Gefäße mit Aqua destillata befeuchtetes rotes Lackmuspapier angebracht wurde. Beobachtet wurde Zeitpunkt und Intensität der auftretenden Bläuung.

Es ergab sich nur eine ganz geringe gärungverhütende Fähigkeit erwähnter Harnantiseptika. Ferner wurden untersucht Chinosol und Yatren, die ebenfalls nur geringe Wirkung besaßen.

Hieraus zog ich den Schluß, daß die Bohnenurease als Hauptfaktor der Harnstoffspaltung anzusprechen war. In der Literatur [18]) sind physikalische Maßnahmen und Chemikalien angegeben, um die Bohnenurease zu schädigen. Hier wird betont, daß die in vielen Phanerogamen nachweisbaren Ureasen ein abweichendes Verhalten von einander aufweisen. Es waren daher von vornherein die größtenteils an der Sojabohnenurease gefundenen Resultate nicht mit Sicherheit auf die Lupinus-albus-Urease übertragbar. Weiterhin mußte beachtet werden, daß Chemikalien nur dann Verwendung finden konnten, wenn mit Sicherheit eine bohnenschädigende Wirkung ausgeschlossen werden konnte.

Versuche, die Urease durch Kältewirkung zu schädigen, führten nicht zu einem verwendbaren Ergebnis. Nach Moll [19]), van Slyke [19]), Cullen [19]), Groll [19]) ist die Urease hitzeempfindlich. Anstellung der Versuche bei hoher Temperatur kam jedoch nicht in Betracht, da ein Absterben der Bohnenzellen die Folge sein mußte. So blieb allein der Versuch übrig, durch Zusatz von chemischen Substanzen die Ureasewirkung zu paralysieren. Nach Jakoby [20]) ist Fluor gegenüber der Urease am wirksamsten. Zu dem gleichen Resultat kam Wester, der bei Anwendung von 1,3 %igem Natriumfluorid eine fast völlige Paralysierung, bei 0,33 %igem eine Hemmung von 75 % fand. Hoso Kawa fand nur mäßige Wirkung des Natriumfluorids.

In den von mir mit Natriumfluorid angestellten Versuchen, die Ureasewirkung zu hemmen, ergab sich bei Anwendung von 1 %igen Konzentrationen eine fast völlige Ureasehemmung. Es zeigte sich jedoch beim Arbeiten mit dieser Substanz, daß die Farbstoffe in den Lösungen mit Natriumfluoridzusatz stärker als in Kontrollösungen ohne diesen Zusatz in die Bohnen diffundierten *). Zugleich zeigte sich die stark kalkfällende Wirkung des Natriumfluorids, indem durch Bildung von unlöslichem Calciumfluorid die Shivelösung entkalkt

---

*) Dies ist rein als Zellschädigung zu erklären, denn wir wissen durch Höber, daß abgestorbene Pflanzenzellen mehr Farbstoff eintreten lassen als lebende.

wurde. Aus diesem Grunde konnte Natriumfluorid in den folgenden Versuchen keine Anwendung finden.

Nach Jakoby [21]) haben Schwermetalle stark hemmende Wirkung. Vor allem erwies sich in seinen mit der Sojabohnenurease angestellten Versuchen das Sublimat als das am stärksten hemmende Schwermetallsalz. Bei Zusatz von 0,02 mg Sublimat zu 10 ccm einer 0,3 %igen Ureaselösung und 20 ccm einer 2 %igen Harnstofflösung fand er völlige Hemmung, die von ihm als Inaktivierung durch Bildung einer Komplexverbindung zwischen Sublimat und der Urease erklärt wird.

In den von mir mit Sublimat angestellten Versuchen ergab sich nur eine geringe Wirkung dieser Substanz, und in Kontrollen ohne Sublimatzusatz zeigte sich wie beim Natriumfluorid, daß die Farbstoffe in Sublimatlösungen stärker in die Bohnen eindrangen als ohne Sublimatzusatz. Durch die Untersuchungen von I. Liebig [22]) wissen wir, daß der Harnstoff mit Quecksilbersalzen kristallinische Verbindungen eingeht. So sind z. B. vom Merkurinitrat drei Harnstoffverbindungen bekannt, die von erwähntem Autor eingehend untersucht wurden. Somit war das Sublimat und andere Quecksilberverbindungen für meine Versuche nicht brauchbar.

Von anderen Substanzen wurden untersucht: Hydrochinon, das nach Euler [23]) eine hemmende Wirkung entfaltet, Jodsalze, die Jakoby [20]) als stark wirksam bezeichnet. Beide Substanzen entfalteten nur geringe Wirkung. Blausäure zeigte gar keine Wirkung. Diphenylarsinchlorid, das nach Rona [24]) und György [24]) völlig paralysiert, hatte geringe Wirkung.

Dagegen erwies sich unter verschiedenen untersuchten Arsenpräparaten Natriumarsenit als stark wirksam, wobei eigentümlicherweise die Wirkung dieser Substanz bei kleinen Dosen stärker hemmend war als bei großen Dosen. In nachstehenden Versuchen wurde daher 1 mg Natriumarsenit pro 100 ccm Farbstofflösung verwandt. Bei dieser Konzentration ergab die Prüfung mit Lackmuspapier nach 24 Stunden keine Blaufärbung, dagegen ergab die Neßlersche Probe, die als feines Reagenz auf Ammoniumkarbonat herangezogen wurde, einen positiven Ausfall. Es gelingt auch mit dieser Substanz nicht, die Hydrolyse des Harnstoffes völlig zu verhindern.

Um quantitativ angeben zu können, wieviel Ammoniumkarbonat in den Harnstofflösungen mit Arsenzusatz entstand, kam folgendes Verfahren zur Anwendung:

> In Reagenzgläsern wurden Verdünnungsreihen mit Ammoniumkarbonat angelegt und zu der Flüssigkeit in den einzelnen Reagenzgläsern eine stets gleichgroße Menge Neßlers Reagenz zugesetzt. Es zeigte sich dabei, daß die Farbe des entstehenden Niederschlags bei Steigerung der Ammoniumkarbonatkonzentration vom Gelb in ein kräftiges Braun überging. Somit war

es möglich, auf kolorimetrischem Wege annähernd die in den Harnstofflösungen entstehenden Ammoniumkarbonatmengen quantitativ zu erfassen. In den nachstehenden Versuchen wurden solche Bestimmungen zu jedem Versuch vorgenommen. Da dies jedoch in den Harnstoff-Farblösungen nicht möglich war, mußten diese Bestimmungen in Harnstofflösungen ohne Farbstoff stattfinden. Sie wurden in 1 %igen Harnstofflösungen vorgenommen. Da eine nennenswerte Verschiebung der Wasserstoffionenkonzentration durch die Farbstoffe nicht stattfindet, können die so nachgewiesenen Ammoniumkarbonatmengen den in den Harnstoff-Farblösungen gebildeten Mengen gleichgesetzt werden.

Die hemmende Wirkung des Natriumarsenits konnte dadurch verbessert werden, daß 1. die in den Harnstofflösungen auftretenden Arsenmengen dadurch verringert wurden, daß statt 10 Bohnen in jeder Schale in den ersten Versuchen nur 3 Bohnen pro Schale verwendet wurden *), 2. durch eine ganze Reihe von Maßnahmen versucht wurde, den Diffusionsprozeß der Farbstoffe zu beschleunigen. Dies konnte dadurch erreicht werden, daß die zu den Versuchen verwandten Bohnen 5 Stunden in Shivelösung vorquellen mußten, bevor sie in die Farblösungen eingelegt wurden. Im bereits aufgequollenen Zustand findet eine wesentlich raschere Diffusion statt. Die Farbstoffkonzentration wurde von 0,2 % auf 0,5 % erhöht. Ferner wurden nur solche Farbstoffe verwandt, die sich durch schnelle Diffusion auszeichnen. Eine große Gruppe von Farbstoffen mußte somit von vornherein ausscheiden, nämlich alle die, welche langsam oder gar nicht in pflanzliche Zellen diffundieren. Je disperser ein Farbstoff, um so schneller und ausgiebiger pflegt er zu diffundieren. In den Baurschen Versuchen zeigte sich die Größe der Diffusion abhängig vom Dispersionsgrad der Farbstoffe. Höber [25]) macht darauf aufmerksam, daß zahlreiche Pflanzenzellen sich auch mit hochdispersen Säurefarbstoffen nicht färben. Es galt daher, unter zahlreichen Farbstoffen diejenigen herauszufinden, die schon innerhalb kurzer Zeit in die Bohnenzellen eindringen.

---

*) Um eine beweisende Anzahl von gefärbten Bohnen zu erhalten, wurde jeder der Versuche dreimal angestellt.

Saure Farbstoffe.

Orange.

Versuch Nr. 7.

200 ccm einer 1 % Orangelösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
15 Stunden . . .	++	++	++(+)	+++
15 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,0075 % $(NH_4)_2CO_3$			
24 „ . . .	+++	+++	+++	+++
24 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Erioglaucin.

Versuch Nr. 8.

200 ccm einer 0,5 % Erioglaucinlösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
12 Stunden . . .	+	+	+	++
12 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,006 % $(NH_4)_2CO_3$			
24 „ . . .	+	+	++	+++
24 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Eosin.

Versuch Nr. 9.

200 ccm einer 0,5 % Eosinlösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 19 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
12 Stunden . . .	+	+	+	+
12 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,006 % $(NH_4)_2CO_3$			
20 „ . . .	+	+	++	+++
20 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Azorubin.

Versuch Nr. 10.

200 ccm einer 0,5 % Azorubinlösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 19 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
12 Stunden . . .	+	+	+	+(+)
12 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,0075 % $(NH_4)_2CO_3$			
20 „ . . .	+	+	+(+)	++
20 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Indigocarmin.

Versuch Nr. 11.

200 ccm einer 0,5 % Indigocarminlösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 21 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
15 Stunden . . .	+	+	+	++
15 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,006 % $(NH_4)_2CO_3$			
24 „ . . .	+	+	++	+++
24 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Lichtgrün.

Versuch Nr. 12.

200 ccm einer 0,5 % Lichtgrünlösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
12 Stunden . . .	—	—	—	—
12 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,006 % $(NH_4)_2CO_3$			
24 „ . . .	+	+	—	—
24 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Fuchsin S.

Versuch Nr. 13.

200 ccm einer 0,5 % Säurefuchsinlösung und 3 Bohnen in jeder Schale. Temperatur 21 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
12 Stunden . . .	—	—	—	—
12 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,0075 % $(NH_4)_2CO_3$			
24 „ . . .	+	+	—	—
24 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Basische Farbstoffe.

Safranin.

Versuch Nr. 14.

200 ccm einer 0,5 % Safraninlösung und 3 Bohnen in jeder Schale. Temperatur 20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
9 Stunden . . .	+	+	+	++
9 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,001 % $(NH_4)_2CO_3$			
22 „ . . .	+	+	++	+++
22 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,009 % $(NH_4)_2CO_3$			

Bismarckbraun.

Versuch Nr. 15.

200 ccm einer 0,5 % Bismarckbraunlösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 21 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
10 Stunden . . .	+	+	+	++
10 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,003 % $(NH_4)_2CO_3$			
20 „ . . .	+	+	++	+++
20 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,008 % $(NH_4)_2CO_3$			

Nilblau.

Versuch Nr. 16.

200 ccm einer 0,5 % Nilblaulösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 19 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
15 Stunden . . .	+	+	+	+
15 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,006 % $(NH_4)_2CO_3$			
24 „ . . .	+	+	+	+(+)
24 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Toluidinblau.

Versuch Nr. 17.

200 ccm einer 0,5 % Toluidinblaulösung und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
18 Stunden . . .	+	+	+	++
18 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,008 % $(NH_4)_2CO_3$			
24 „ . . .	+	+	++	++
24 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Gentianaviolett.

Versuch Nr. 18.

200 ccm einer 0,5 % Gentianaviolettlösung
und 3 Bohnen in jeder Schale.
Temperatur 20 ° C.

Zeitpunkt der Ablesung nach Versuchsbeginn	Ohne Harnstoff		Mit Harnstoff mit As. 1 : 105	
	ohne As.	mit As.	0,5 %	1 %
18 Stunden . . .	+	+	+	+
18 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,008 % $(NH_4)_2CO_3$			
24 „ . . .	+	+	+	+(+)
24 „ . . .	Neßlersche Probe: 0,01 % $(NH_4)_2CO_3$			

Ergebnisse dieser Versuchsreihe.

1. Saure Farbstoffe.

Die Versuche Nr. 7-11 zeigen, daß in den Harnstoff-Farblösungen ein vermehrtes Eindringen der Farbstoffe in die Bohnen gegenüber den Kontrollen stattfindet. In den 1%igen Harnstofflösungen zeigt sich bei einer Reihe von Farbstoffen diese Wirkung schon sehr frühzeitig, so beim Erioglaucin nach 12 Stunden, beim Orange und Indigokarmin nach 15 Stunden. Beim Eosin und Azorubin ist die Zeitspanne bis zum Sichtbarwerden einer deutlichen Differenz in den eingedrungenen Farbstoffmengen eine größere; erst nach 20 Stunden ist die Farbe in die Harnstoffbohnen vermehrt eingedrungen. Bei den $^1/_2$%igen Harnstofflösungen sind dagegen stets 24 Stunden erforderlich, um mit Sicherheit ein stärkeres Durchgefärbtsein der Harnstoffbohnen zu konstatieren.

Ein anderes Ergebnis in Versuch Nr. 12 und 13. Hier zeigt sich, daß nach 12 Stunden weder in den Harnstofflösungen noch in den Kontrollösungen eine Färbung der Bohnenzellen eingetreten ist. Nach 24 Stunden sind Lichtgrün und Säure-Fuchsin in geringem Ausmaß in die Zellen der Kontrollbohnen eingedrungen, nicht aber in die Harnstoffbohnen. Die Erklärung für dieses abweichende Verhalten gibt die Beobachtung, daß in den Harnstoff-Farblösungen eine deutliche Ausfällung der Farbe erfolgte, so daß die Farbflüssigkeit sich aufhellte.

Die Bestimmung der zu jedem Versuch trotz Natriumarsenitzusatzes gebildeten Ammoniumkarbonatmengen mit Neßlers Reagenz ergab, daß in den 1%igen Harnstofflösungen nach 24 Stunden nie mehr als 0,01% Ammoniumkarbonat gebildet worden war. Dies ist eine Menge, die weit unter der diffusionssteigernden Ammoniumkarbonatkonzentration liegt. (Siehe die Versuche Nr. 5 und 6.)

Von anderen sauren Farbstoffen wurden untersucht: Kongorot, Trypanblau, Hessisch-Brillantpurpur und Rosindulin. Bei erstgenannten drei Farbstoffen zeigte sich, daß nach 24 Stunden überhaupt kein Farbstoff in die Bohnen eingedrungen war. Beim Kongorot war dies sogar nach 48 Stunden nicht der Fall. Kongorot und Trypanblau sind als hochkolloidale, schwer diffundierende Farbstoffe bekannt. Dagegen war vom Hessisch-Brillantpurpur ein anderes Verhalten zu erwarten. Auf Grund seiner vier Sulfosäuren ist dieser Farbstoff hochgradig dispers, so daß eigentlich eine schnelle und starke Diffusion zu erwarten war. In den Schulemannschen [26]) Gelatinediffusionsversuchen war dies auch der Fall. Hessisch-Brillantpurpur wäre somit einer der Farbstoffe, von denen Höber sagt, daß sie trotz ihres hohen Dispersionsgrades nicht in Pflanzenzellen aufgenommen werden.

Rosindulin zeigte das gleiche Verhalten wie Fuchsin und Lichtgrün, indem es in den Harnstofflösungen ausflockte. Die Harnstoffbohnen waren weniger durchgefärbt als die Kontrollbohnen.

2. Basische Farbstoffe.

Wie die Versuche 14-18 zeigen, findet in Lösungen basischer Farbstoffe bei Harnstoffzusatz ein vermehrtes Eindringen der Farbstoffe statt. Beim Safranin ist in den 1%igen Harnstofflösungen bereits nach 9 Stunden mehr Farbe in die Bohnen eingedrungen als in den Kontrollösungen; beim Bismarckbraun nach 10 Stunden. Auffallend war bei diesem Farbstoff, daß trotz nach 20 Stunden sichtbarer Ausflockung der Farbe in den Harnstofflösungen doch die Harnstoffbohnen stärker durchgefärbt waren als die Kontrollbohnen.

Beim Nilblau und Gentianaviolett ließ sich eine sichere Entscheidung über vermehrtes Eindringen nicht treffen.

Die Versuche mit Toluidinblau zeigten ein deutliches vermehrtes Eindringen des Farbstoffes bei Harnstoffzusatz. Bei diesem Farbstoff war auf Leuco-Verbindungen zu achten. Während zunächst beim Aufschneiden der Bohnen kaum Farbstoff eingedrungen zu sein schien, zeigte sich bei längerem Liegenlassen sowie beim Zusatz von Oxydationsmitteln, daß Farbstoff in ausgiebigem Maße eingedrungen war und daß die Harnstoffbohnen stärker als die Kontrollbohnen durchgefärbt waren.

Die Farbstoffe Malachitgrün und Dahlia ergaben bei Harnstoffzusatz Ausflockungen. Die Harnstoffbohnen waren aus diesem Grunde weniger gefärbt als die Nichtharnstoffbohnen. Die nach 24 Stunden gebildete Ammoniumkarbonatmenge betrug 0,01%, eine Menge, die $^1/_{10}$ der zur Diffusionssteigerung erforderlichen Ammoniumkarbonatmenge beträgt.

Zusammenfassung.

Die Versuche bringen eine Bestätigung der von Baur und seinen Mitarbeitern am Tier oder Tierpräparat und von Klewitz und Michalowsky an Pflanzensamen gefundenen Ergebnisse. Es ließ sich zeigen, daß bei Harnstoffzusatz zu bestimmten Farblösungen Farbstoff in stärkerem Ausmaß in die Samenzellen von Lupinus albus eindringt als ohne Harnstoff.

Diese Harnstoffwirkung schien zunächst auf dem bei der Zersetzung des Harnstoffs in den Farblösungen entstandenen Ammoniumkarbonat zu beruhen; denn Ammoniumkarbonatzusatz an Stelle des Harnstoffs ließ gleichfalls Farbstoff in stärkerem Maß in die Bohnenzellen eindringen. Durch Hemmung der Harnstoffzersetzung und damit der Ammoniumkarbonatbildung durch Schädigung der als

Ursache für diese Zersetzung ermittelten Bohnenurease mittels Natriumarsenitzusatzes konnte gezeigt werden, daß auch dann noch Farbstoff in stärkerem Ausmaß in die Bohnenzellen eindrang. Die trotz Natriumarsenitzusatzes in den Farblösungen entstandene Ammoniumkarbonatmenge betrug am Ende der Versuchszeit $^1/_{10}$ der kleinsten Ammoniumkarbonatmenge, mit der sich eine vermehrte Durchfärbung der Bohnenzellen erreichen läßt. Das gesteigerte Eindringen der Farbstoffe bei Harnstoffzusatz ist somit durch den Harnstoff selbst bedingt.

Zum Schluß ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Klewitz für die Überlassung des Themas und freundliche Hilfe zu danken. Herrn Dr. med. Habs danke ich für mithelfende Beratung.

Literaturverzeichnis.

1. Baur, Archiv f. exp. Pathol. und Pharmakol. Bd. 167 (1932), Seite 140.
2. Hoffmann: Inaugural-Dissertation, Marburg 1933.
3. Kroeplin: Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
4. Lorenz: Inaugural-Dissertation, Kiel 1931.
5. Mißfeld: Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
6. Fries: Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
7. Hermelingmeier: Inaugural-Dissertation, Kiel 1930.
8. Fatheuer: Inaugural-Dissertation, Marburg 1933.
9. Utz: Inaugural-Dissertation, Kiel 1931.
10. Dellen: Inaugural-Dissertation, Kiel 1932.
11. Keeser: Archiv f. exp. Pathol. und Pharmakol. Bd. 167 (1932), Seite 276.
12. Baur und Schumann: noch nicht veröffentlicht.
13. Klewitz und Michalowsky: noch nicht veröffentlicht.
14. Höber: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe.
15. Lepeschkin: Ber. d. deutsch. bot. Gesellschaft, Bd. 26a (1908), Seite 198, 231.
16. Tröndle: Ber. d. deutsch. bot. Gesellschaft, Bd. 27 (1909), Seite 71.
17. Muenk: Landw. Vers. Stat. Bd. 85 (1912), Seite 393.
18. Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen, Leipzig 1929, Bd. 2, Seite 782.
19. Euler: Chemie der Enzyme, München 1927, Bd. 2.
20. Jakoby: Biochem. Ztschr. Bd. 214 (1929), Seite 368.
21. Jakoby: Biochem. Ztschr. Bd. 76 (1916), Seite 275.
22. Liebig: Annalen der Chemie und Pharmazie Bd. 85 (1853), Seite 289.
23. Euler: Chemie der Enzyme, München 1927, Bd. 2.
24. Rona und György: Biochem. Ztschr. Bd. 111 (1927), Seite 134.
25. Höber: Physikalische Chemie der Zellen und Gewebe.
26. Schulemann: Biochem. Ztschr. Bd. 80 (1917), Seite 1.

Lebenslauf.

Am 29. Oktober 1909 wurde ich, Wilhelm Moritz, als Sohn des Redakteurs Ernst Moritz und seiner Ehefrau Sabine, geb. Corte, in Berlin geboren.

Nach Besuch des Gymnasiums in Zerbst und später des König-Wilhelms-Gymnasiums in Magdeburg legte ich am 6. März 1928 die Reifeprüfung ab.

Mein medizinisches Studium begann ich in Jena, wo ich am 2. August 1930 das Physikum bestand. Dann studierte ich in München, Rostock, Leipzig. In den letzten drei Semestern studierte ich in Marburg. Dort bestand ich am 12. Januar 1934 das medizinische Staatsexamen.

Zur Zeit bin ich Medizinal-Praktikant am städtischen Krankenhaus zu Eisenach.

Meine akademischen Lehrer waren:

in Jena:

Abel, Graeper, Kiesewalter, Maurer, Plate, Renner, Schneider, Schulz, Sieverts, von Skramlik, Wien.

in München:

Borst, Müller, von Zumbusch.

in Rostock:

Brüning, Curschmann, Fischer, von Gaza, Mainzer.

in Leipzig:

Gros, Heim, Hueck, Kortzeborn, Kruse, Lange, Payr, Sellheim.

in Marburg:

Baur, Eimer, Freudenberg, Göppert, Grüter, Hildebrand, Kehrer, Klapp, Klewitz, Kretschmer, Naujoks, Neumann, Pfannenstiel, Rix, Ruete, Schwenkenbecher, Uffenorde, Versé, Wiedkopf.